

• 论著 •

连续 6 天睡眠剥夺对大鼠甲状腺功能及抗甲状腺抗体影响的研究

董作亮 谭丽 褚晨晨 王帆 高兴 乔潇 李珊 梁钰涵 张媛 林来祥

【摘要】目的 研究连续 6 d 睡眠剥夺对 Wistar 大鼠甲状腺功能及抗甲状腺抗体的影响。**方法** 健康 3 月龄 Wistar 大鼠 30 只,随机数字法分为睡眠剥夺组(SD 组)、实验对照组(TC 组)、空白对照组(CC 组),每组雌鼠、雄鼠各 5 只,利用“小平台水环境法”建立大鼠睡眠剥夺模型,以大平台及正常笼养组分别作为实验对照和空白对照。将 SD 组和 TC 组大鼠置于 24 h 拟光照环境中,对 SD 组大鼠进行连续 6 d 睡眠剥夺;CC 组模拟正常作息,饲养在每天 12 h 拟光照、12 h 黑暗的环境中。6 d 后股动脉放血处死所有大鼠,留取甲状腺组织及血液,采用化学发光免疫分析法检测不同组大鼠血清总 T_3 (TT₃)、总 T_4 (TT₄)、游离 T_3 (FT₃)、游离 T_4 (FT₄)、促甲状腺激素(TSH)水平,采用放射免疫分析法检测血清甲状腺过氧化物酶(TPO)抗体、甲状腺球蛋白(Tg)抗体和 Tg 浓度。**结果** SD 组大鼠 TT₃ 水平较 TC 组和 CC 组明显升高(P 均 <0.05);TT₄、FT₄ 水平明显低于 TC 组和 CC 组(P 均 <0.05);FT₃、Tg 水平略有升高;TSH、TPO 抗体、Tg 抗体水平较 TC 组和 CC 组差异无统计学意义。**结论** 连续 6 d 睡眠剥夺可影响大鼠甲状腺功能,但甲状腺功能尚可可通过增加 T_4 向 T_3 转换而代偿。

【关键词】 睡眠剥夺;甲状腺功能;抗甲状腺抗体;大鼠

Study on thyroid function and anti-thyroid antibodies changes of Wistar rats during sleep deprivation

Dong Zuoliang^{*△}, Tan Li[△], Chu Chenchen, Wang Fan, Gao Xing, Qiao Xiao, Li Shan, Liang Yuhuan, Zhang Yuan, Lin Laixiang. *Department of Medical Laboratory, The General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

[△] These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Lin Laixiang, Email: linlaixiang2005@126.com

【Abstract】 Objective To study the effects of sleep deprivation for six-consecutive-day on thyroid function and anti-thyroid antibodies in Wistar rats. **Methods** Thirty rats aged 3 month healthy Wistar were randomly divided into three groups according to a random number table: sleep deprivation group (SD group), tank cage group (TC group) and control group (CC group), with five females and five males in each group. Sleep deprivation was induced in rats by housing them on small platforms over water. Controls were housed either in tanks with large platforms (TC group) or in normal cage (CC group). Rats in SD group and TC group were placed in 24-hour proposed lighting environment, and rats in SD group were deprived of sleep for 6 consecutive days. Rats in CC group were placed in 12 hours light and 12 hours dark environment. Six days later, all rats were sacrificed, thyroid tissue and blood from femoral artery were saved. Total T_3 (TT₃), total T_4 (TT₄), free T_3 (FT₃), free T_4 (FT₄) and thyroid stimulating hormone (TSH) in serum were detected by chemiluminescence immunoassay, and the level of anti-thyroid peroxidase (TPOAb), anti-thyroglobulin (TgAb) and thyroglobulin (Tg) were evaluated by radioimmunoassay. **Results** TT₃ in SD group were significantly higher than that of rats in TC and CC group (all $P < 0.05$). Compared with TC and CC group, the concentrations of TT₄, FT₄ were lower (all $P < 0.05$), and FT₃ and Tg concentrations were a little higher. No significant changes were found in TSH, TPOAb and TgAb among the three groups. **Conclusion** Six consecutive days of sleep deprivation can influence thyroid function, but can be compensated by transferring more T_4 to T_3 .

【Key words】 Sleep deprivation; Thyroid function; Antithyroid antibodies; Rats

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34: 225-228)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2014.04.003

基金项目:天津医科大学大学生学术研究资助计划;天津医科大学基础医学院大学生科研基金

作者单位:300052 天津医科大学总医院医学检验科(董作亮);天津医科大学基础医学院(谭丽,褚晨晨,王帆,乔潇,李珊,梁钰涵,张媛),药学院(高兴);天津医科大学代谢病医院内分泌研究所,卫生部激素与发育重点实验室(林来祥)

董作亮,谭丽为并列第一作者

通信作者:林来祥,Email:linlaixiang2005@126.com

睡眠是人体所必须的主动过程,是机体复原、整合和巩固记忆的重要环节,是健康不可缺少的组成部分。睡眠剥夺是指人正常睡眠量得不到满足的状态。随着现代生活节奏加快及社会竞争加剧,睡眠剥夺已经成为一个非常重要的社会问题。在某些职业或人群,如医生、飞行员、作战战士等,睡眠剥夺不可避免。为了引起人们对睡眠重要性和睡眠质量关注,国际精神卫生组织主办的全球睡眠和健康计划于 2001 年发起了一项全球性活动——将每年 3 月 21 日定为“世界睡眠日”。2003 年中国睡眠研究会把“世界睡眠日”正式引入中国。

如今,由于睡眠剥夺造成的相关疾病日益增加,国内、外专家做了大量睡眠剥夺的相关研究,但其研究领域主要集中在学习记忆、免疫功能、认知功能等方面^[1]。在甲状腺研究方面只进行了初步的人群研究,而对甲状腺功能及相关抗甲状腺抗体的研究罕见报道,且尚无统一论。本实验利用 Wistar 大鼠,观察睡眠剥夺对甲状腺功能、抗甲状腺抗体浓度的影响,探讨其机制,为相关疾病的预防、临床治疗提供可能的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 选用 3 月龄的健康成年 Wistar 大鼠(购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,属 SPF/VAF 级动物)30 只,雌、雄各半。大鼠在天津医科大学动物中心[编号:SYXK(津)2004-0001]饲养。适应性喂养 10 d 后,随机分为睡眠剥夺组(SD 组)、实验对照组(TC 组)、空白对照组(CC 组),每组雌鼠、雄鼠各 5 只。利用“小平台水环境法”制备大鼠睡眠剥夺模型,制作 30 cm × 30 cm × 30 cm 睡眠剥夺箱,内置一直径为 6.3 cm 的平台,平台周边注满水,水面距平台面约 1 cm;于平台上 14 cm 处放置笼盖,上放置水和食物;大鼠在平台上可以自由饮食饮水,若睡眠则由于肌张力降低而落入水中,惊醒后自动爬上平台。水温维持在 20 ℃左右,每日更换箱中的水。TC 组平台直径为 18 cm,大鼠在平台上有一定活动空间,可以睡眠,其余条件同 SD 组。CC 组单笼饲养。将 SD 组和 TC 组大鼠置于 24 h 拟光照环境中,对 SD 组大鼠进行连续 6 d 的睡眠剥夺;CC 组模拟正常作息,饲养在每天 12 h 拟光照,12 h 黑暗的环境中。6 d 后股动脉放血处死所有大鼠,留取甲状腺组织及血液。上述各组大鼠均作为实验的研究对象进行研究。各组大鼠均饲以普通鼠饲料(平均碘含量为 300 μg/kg)、去离子水(碘含量为 0 μg/L)。每日定时记录大鼠的摄食量、体质量、饲养环境的

温度以及观察睡眠剥夺组、实验对照组及空白对照组大鼠在行为、反应能力,进食及皮毛光泽等方面的差异。

1.2 测定指标与方法

1.2.1 血清 TT₃、TT₄、FT₃、FT₄、TSH 浓度的测定 采用化学发光免疫分析法(CLIA)及德国西门子试剂盒,测定血清总 T₃(TT₃)、总 T₄(TT₄)、游离 T₃(FT₃)、游离 T₄(FT₄)、促甲状腺激素(TSH)浓度。

1.2.2 血清甲状腺过氧化物酶(TPO)抗体、甲状腺球蛋白(Tg)抗体、Tg 的测定 采用放射免疫分析法测定血清 TPO 抗体、Tg 抗体和 Tg 水平,试剂盒购自北京北方生物技术研究所以。

1.3 统计学处理 采用 Excel 建立数据库,SPSS16.0 统计软件包进行数据统计与分析。各激素水平用“均值 ± 标准差”表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 或 Tamhane's T2 分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠睡眠剥夺后一般状态观察 SD 组大鼠精神萎靡,身体虚弱,消瘦,皮毛无光泽,随睡眠剥夺时间延长,间隔一段时间掉入水中,且频率随睡眠剥夺时间延长而增高。睡眠剥夺初期,大鼠兴奋性提高,对刺激反应敏捷;至睡眠剥夺第 6 天,大鼠表现出狂躁,易“激惹”症状,出现尖叫行为。

2.2 SD、TC、CC 组大鼠血清甲状腺激素检测结果 与 CC 组相比,SD 组大鼠血清 TT₃ 水平明显升高($P = 0.013$),且从 CC 组、TC 组至 SD 组,大鼠血清 TT₃ 水平依次升高;然而与 CC 组相比 SD 组大鼠血清 TT₄ ($P = 0.001$)和 FT₄ ($P = 0.003$)水平显著下降,且 TT₄ 下降幅度更大;与 CC 组相比,SD 组大鼠血清 FT₃ 水平轻微升高,TSH 水平无明显变化,见表 1。

2.3 SD、TC、CC 组大鼠血清相关抗甲状腺抗体检测结果 与 TC 组、CC 组相比,SD 组大鼠血清 Tg 抗体、TPO 抗体水平无明显变化,而 Tg 水平有升高趋势,但无统计学意义,见表 2。

2.4 SD、TC、CC 组大鼠体质量和甲状腺质量的变化 SD 组大鼠的睡眠剥夺实验末的体质量与其睡眠剥夺实验前相比,呈明显减少趋势;而 TC 组大鼠实验末体质量较实验前轻微增加,CC 组大鼠实验末体质量明显高于实验前,但二者均无统计学差异(P 均 > 0.05),见表 3。

3 讨论

睡眠剥夺是生活中一种较为强烈的刺激因素,在现代生活中睡眠剥夺现象普遍存在。睡眠不足或

表 1 SD、TC、CC 组大鼠甲状腺激素水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TT ₃ (nmol/L)	TT ₄ (nmol/L)	FT ₃ (pmol/L)	FT ₄ (pmol/L)	TSH (mIU/L)
SD 组	10	1.51 ± 0.28 ^a	34.23 ± 13.60 ^b	7.54 ± 1.57	24.43 ± 3.39 ^b	0.11 ± 0.03
TC 组	10	1.24 ± 0.18	43.16 ± 13.17	6.32 ± 1.16	26.84 ± 3.97	0.11 ± 0.04
CC 组	10	1.26 ± 0.12	56.82 ± 14.19	6.43 ± 0.93	29.64 ± 3.14	0.10 ± 0.02

注:与 CC 组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$; SD 组:睡眠剥夺组;TC 组:实验对照组;CC 组:空白对照组;TT₃:总三碘甲状腺原氨酸;TT₄:总甲状腺素;FT₃:游离三碘甲状腺原氨酸;FT₄:游离甲状腺素;TSH:促甲状腺激素

表 2 SD、TC、CC 组大鼠相关抗甲状腺抗体水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Tg 抗体(%)	TPO 抗体(%)	Tg(IU/ml)
SD 组	10	1.75 ± 0.76	8.39 ± 0.93	6.13 ± 0.77
TC 组	10	1.92 ± 0.86	7.87 ± 0.38	5.62 ± 1.10
CC 组	10	1.54 ± 0.63	8.10 ± 0.44	5.47 ± 1.38

注:SD 组:睡眠剥夺组;TC 组:实验对照组;CC 组:空白对照组;TPO 抗体:甲状腺过氧化物酶抗体;Tg 抗体:甲状腺球蛋白抗体;Tg:甲状腺球蛋白

表 3 SD、TC、CC 组大鼠体质量、甲状腺质量($\bar{x}\pm s$)

组别	n	大鼠实验前体质量(g)	大鼠实验末体质量(g)	甲状腺的绝对质量(mg)	甲状腺的相对质量(mg/100g)
SD 组	10	281.74 ± 40.98	261.48 ± 44.53	18.78 ± 3.50	7.27 ± 1.27
TC 组	10	262.56 ± 34.55	266.51 ± 44.50	17.85 ± 2.14	6.79 ± 0.94
CC 组	10	265.06 ± 42.17	288.20 ± 53.49	18.15 ± 3.06	6.55 ± 1.87

注:SD 组:睡眠剥夺组;TC 组:实验对照组;CC 组:空白对照组

睡眠剥夺会对机体各个方面造成负面影响。因此,在日常的医疗检查中应该考虑把睡眠数量和质量作为评估最佳睡眠和睡眠健康的重要指标,尤其是心理治疗肥胖窘迫、各种慢性疾病等。

大量研究表明,当人或动物处于睡眠剥夺状态时,其中枢神经系统功能及各项生理特征可受到明显影响,对人们的社会功能、身心健康造成了巨大的负面影响^[2]。偶尔失眠会造成第 2 天疲倦、动作不协调以及情绪的波动等情况;长期睡眠剥夺则会带来注意力不能集中、记忆出现障碍和工作力不从心等后果^[3]。睡眠剥夺甚至可影响人的免疫系统,与多种疾病的发生密切相关。据不完全统计,睡眠剥夺引起人体相关疾病多达 80 余种。

如今,由睡眠剥夺造成的相关疾病日益增加,睡眠剥夺对激素水平、甲状腺功能及各脑区(下丘脑、垂体、海马、皮层)学习记忆和细胞凋亡相关基因表达的影响引起了人们极大的关注,成为神经科学和睡眠医学领域的研究热点。研究发现,大鼠随着睡眠剥夺时间的延长,血清促肾上腺皮质激素含量先呈现轻微升高的趋势,在睡眠剥夺 3 d 时达到最高值,之后呈明显的下降趋势;TSH、皮质醇含量先呈逐渐升高趋势,均在睡眠剥夺 5 d 时达到最高值后逐渐降低;FT₃、FT₄ 呈下降趋势^[4]。然而人群研究表明,连续

14 d 的部分睡眠剥夺主要使女性参与者血清 TSH、FT₄ 水平显著降低^[5]。连续 2 d 的部分睡眠剥夺使 FT₃、FT₄ 水平升高^[6]。

本实验采用“小平台水环境法”建立睡眠剥夺动物模型,对大鼠进行连续 6 d 的睡眠剥夺。考虑到水环境、限制活动以及隔离等因素也可能成为大鼠的应激原,因此除 CC 组外,本实验还设立了 TC 组作为实验对照,以排除上述因素对实验结果的影响。实验显示,连续 6 d 睡眠剥夺使 SD 组大鼠的一般状态发生改变,大鼠精神萎靡不振,身体虚弱,消瘦,皮毛无光泽,表现出狂躁,易“激惹”症状。实验发现,与 TC 组和 CC 组相比,SD 组大鼠血清 TT₃ 水平升高,TT₄、FT₄ 水平降低,FT₃ 和 Tg 水平有增加趋势,TSH、TPO 抗体、Tg 抗体水平无明显变化。在机体中,TSH 水平主要受 T₄ 和下丘脑-垂体-甲状腺轴系统的调节。下丘脑-垂体-甲状腺轴系统的活动受两种时间调控中枢机制的影响,正常情况下,TSH 在日间持续处于较低水平,傍晚其分泌量开始快速增加,睡眠开始时即达到高峰;睡眠开始后,TSH 的浓度逐渐下降,显示睡眠对 TSH 的分泌具有抑制作用。有研究表明,随着睡眠剥夺时间的延长,TSH 水平先呈逐渐升高趋势,至睡眠剥夺 5 d 时达到最高值,之后呈明显下降趋势^[4]。本实验研究连续 6 d 睡眠剥

夺,与 TC 组和 CC 组相比,SD 组大鼠血清 TSH 水平基本无变化。这可能是由于 TSH 高峰水平已过或者长时间睡眠剥夺使迷走神经兴奋从而抑制下丘脑-垂体-甲状腺轴系统功能。对机体绝大多数组织而言,血清 T_4 需首先经脱碘作用生成活性更高的 T_3 ,再调节机体的生长、发育和代谢平衡。研究表明,脱碘反应是调节甲状腺激素生物活性的重要方式,目前体内已发现 3 种脱碘酶,即 I、II、III 型。其中 I 型脱碘酶主要分布在肝、肾和甲状腺,而且在肝、肾中的表达量最高。血清中的 T_3 主要来自 T_4 通过肝组织 I 型脱碘酶的脱碘作用产生。 T_4 水平下降主要是由于连续 6 d 睡眠剥夺导致甲状腺功能和下丘脑-垂体-甲状腺轴系统受到抑制,也可能是因为睡眠剥夺造成肝功能受损,甲状腺结合球蛋白合成减少,导致 T_4 下降^[7]。由于 TT_4 、 FT_4 水平降低,脱碘酶活性会代偿性增加,进而使 FT_4 向 FT_3 的转化增多,血清 TT_3 水平升高,与实验结果相符。 T_g 由甲状腺滤泡上皮细胞产生并贮存于甲状腺滤泡中,相对分子质量 66 000,周围血中 T_g 的唯一来源是甲状腺组织,是合成、储存甲状腺激素的载体。 T_g 水平升高可以反映甲状腺刺激增生状况,甚至是一个比 TSH 更为敏感的指标^[8]。本实验结果显示大鼠血 T_g 水平具有升高趋势,这与甲状腺相对质量的轻度增加相一致。 T_g 水平仅呈升高趋势,可能是因为睡眠剥夺时间不够长或者 TSH 高峰水平已过。SD 组大鼠血清 TT_3 水平呈升高趋势, TT_4 、 FT_4 水平降低,说明睡眠缺乏时 TT_3 、 TT_4 、 FT_4 在维持机体的正常状态中具有重要的作用,提示长期睡眠不足可能会有类似甲状腺功能异常的症状,进而引发睡眠剥夺后的一系列反应。

睡眠和免疫功能有关,连续数日睡眠剥夺或睡眠紊乱对免疫功能有严重影响^[9]。自身免疫性甲状腺疾病是常见的甲状腺疾病,血中存在多种甲状腺自身抗体,最主要的是 T_g 抗体和 TPO 抗体。TPO 是甲状腺激素合成过程中的关键酶,还具有特殊的免疫学特性,正常情况下并不存在于外周血中。当甲状腺发生病变,机体免疫调节功能紊乱, T_g 和 TPO 释放入外周血,这是由于抑制性 T 细胞细胞缺陷、功能下降和辅助性 T 细胞细胞活性增强,致 B 淋巴细胞产生抗甲状腺组织成分抗 TPO 抗体、抗 T_g 抗体,导致甲状腺的免疫损伤^[9]。有学者认为抗 TPO 抗体在自身免疫性甲状腺疾病的发病中有重要意义^[10]。也有学者提出抗 T_g 抗体的测定在诊断自身免疫性甲状腺疾病中扮演着重要的角色^[11]。本实验发现大鼠

血清 TPO 抗体、 T_g 抗体水平尚未发生变化,可能由于睡眠剥夺时间不够长或者该睡眠剥夺的应激强度不够而使机体仍处于代偿状态。此外,睡眠在能量平衡中起着很重要的作用。在啮齿类动物中,食物短缺或饥饿都会导致睡眠减少,因此,完全睡眠剥夺将会导致食欲过度增加。但由于睡眠剥夺使 SD 组大鼠能量消耗增加较 TC 组和 CC 组更明显,因此 SD 组大鼠虽然摄食量增加但体重反而降低。

综上所述,连续 6 d 睡眠剥夺的 Wistar 大鼠,甲状腺功能虽有变化,但仍处于代偿阶段,提示睡眠剥夺与甲状腺相关疾病存在一定的联系,应该加强对某些特殊职业人群的健康教育和宣传,增强对甲状腺功能的监测,对其科学合理地制定睡眠时间,提高睡眠质量,保障这类重点人群对睡眠的特殊需要,避免给自身造成不利影响。本实验为进一步探讨睡眠剥夺对甲状腺功能及抗甲状腺抗体的影响机制及干预研究提供了基础数据和参考资料,而睡眠剥夺对免疫系统的影响及机制仍需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 江帆,沈晓明,李生慧.慢性不完全性睡眠剥夺对幼鼠生长及学习记忆影响的研究[J].中国当代儿科杂志,2009,11(2):128-132.
- [2] Goel N, Basner M, Rao H, et al. Circadian rhythms, sleep deprivation, and human performance [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013, 119: 155-190.
- [3] 彭华,贺斌,赵忠新.睡眠剥夺对健康人注意力的影响[J].临床神经病学杂志,2009,22(2):133-135.
- [4] 张亚晶,卢才义,高磊.睡眠剥夺对大鼠血清促肾上腺皮质激素、促甲状腺激素及皮质醇的影响[J].中华老年多器官疾病杂志,2009,8(1):61-63.
- [5] Kessler L, Nedeltcheva A, Imperial J, et al. Changes in serum TSH and free T_4 during human sleep restriction [J]. Sleep, 2010, 33(8): 1115-1118.
- [6] Schmid SM, Hallschmid M, Jauch-Chara K, et al. Partial sleep restriction modulates secretory activity of thyrotropic axis in healthy men [J]. J Sleep Res, 2013, 22(2): 166-169.
- [7] 董开源,闫玉博,马珂,等.褪黑素对睡眠剥夺大鼠肝损伤的保护作用[J].山西医科大学学报,2012,43(12):903-906.
- [8] Zimmermann MB, Moretti D, Chaouki N, et al. Development of a dried whole-blood spot thyroglobulin assay and its evaluation as an indicator of thyroid status in goitrous children receiving iodized salt [J]. Am J Clin Nutr, 2003, 77(6): 1453-1458.
- [9] 肖雁,赵忠新.睡眠剥夺对免疫功能和内分泌系统的影响[J].人民军医,2006,49(11):657-658.
- [10] 张艳丽,方佩华.甲状腺过氧化物酶及其抗体与甲状腺疾病[J].国际内分泌代谢杂志,2008,28(1):62-65.
- [11] 李振梅,李国红,杨桂文,等.自身免疫性甲状腺疾病自身抗原 T_g 的研究进展[J].实用医药杂志,2006,23(2):236-238.

(收稿日期:2014-01-10)